



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان

بررسی و مقایسه میزان بیان ژن microRNA 294 (miR-294) در سل لاین ماکروفاژهای J774
آلوده به سویه‌های لیسمانیا تروپیکا پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم

توسط

سجاد ساجدی نیا

اساتید راهنما

دکتر زهرا بابائی | دکتر علی افگار

اساتید مشاور

دکتر ایرج شریفی | دکتر تانیا دهش

سال تحصیلی (شهریور ۹۹)

شماره پایان نامه : (۵۶۲)



**KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES**

Faculty of Medicine

In Partial Fulfilment of the Requirement for the MSc of Medical Parasitology

Title

**Assessment and comparison of microRNA 294 (miR-294) gene expression level
in J774 macrophage cell lines infected with *Leishmania tropica* responsive and
non-responsive to Glucantime**

By

Sajjad Sajedi Nia

Supervisors

1- Dr. Zahra Babaei | 2- Dr. Ali Afgar

Advisors

1- Dr. Iraj Sharifi | 2- Dr. Tania Dehesh

Thesis No: (562)

Date (September, 2020)

چکیده

مقدمه و اهداف: *لیشمانیا تروپیکا* یکی از عوامل ایجاد لیشمانیوز جلدی در انسان می باشد. این انگل برای ایجاد عفونت موفق و حصول اطمینان از بقای خود، راهکارهای پیشرفته ای را جهت سرکوب پاسخ های ماکروفاژ میزبان بکار می گیرد. اخیراً در مورد نقش مولکول هایی بنام میکرو RNA ها در تنظیم ژن های میزبان آلوده توسط لیشمانیا مدارکی بدست آمده است. تا کنون گزارشاتی نیز مبنی بر دخالت این مولکول های کوچک در پاسخ و یا عدم پاسخ انگل به داروهای مختلف منتشر شده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی پروفایل میکرو RNA های ماکروفاژ پس از آلودگی با سویه های *لیشمانیا تروپیکا* پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم است.

روش ها: در این مطالعه، پس از کشت انگل *لیشمانیا تروپیکا* پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم و تیمار سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 با انگل، در ساعت های ۶، ۱۲، ۲۴، و ۷۲، استخراج miRNA صورت گرفت. پس از سنتز cDNA، با استفاده از روش TaqMan real-time PCR، بیان ژن miR-294 در فواصل زمانی یاد شده مورد بررسی قرار گرفت و از تست ANOVA برای آنالیز آماری نتایج، استفاده گردید.

یافته ها: طبق نتایج به دست آمده از real-time PCR، سلول های ماکروفاژ تیمار شده با پروماستیگوت *لیشمانیا تروپیکا* پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم به طور کلی افزایش بیان در ژن miR-294 از خود نشان دادند. بیشترین میزان بیان ژن miR-249 در ارتباط با ساعت ۲۴ بعد از تیمار سلول های ماکروفاژ با پروماستیگوت های انگل پاسخ دهنده به گلوکانتیم بود که افزایش ۴۲۸/۷ fold change بود. همچنین طبق نتایج آنالیز آماری، بیان این ژن بین گروه غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به گلوکانتیم تفاوت معنی داری وجود داشت ($p\text{-value}=0/000$). همچنین، هر کدام از این گروه ها، در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی داری را بین بیان ژن miR-294 نشان دادند ($p\text{-value}=0/000$).

نتیجه گیری: طبق نتایج به دست آمده می توان عنوان کرد که این miRNA در ماکروفاژهای آلوده شده با لیشمانیا تروپیکای پاسخ دهنده به گلوکانتیم، به میزان قابل توجهی افزایش بیان از خود نشان می دهد و احتمالاً در افزایش پاسخ انگل به داروی گلوکانتیم نقش دارد. همچنین، این miRNA می تواند به عنوان

بیومارکری برای عفونت با انگل *لشمانیا تروپیکا* در نظر گرفته شود و در واقع، برای تشخیص، و یا اهداف درمانی و حتی واکسن مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *لشمانیوز، لشمانیا تروپیکا،* ماکروفاژ، miRNA

Abstract

Background and Aim: *Leishmania tropica* is the causative agent of cutaneous leishmaniasis. This protozoan employs advanced approaches for successful establishment of infection and survival in macrophage cells. Recently, there are evidences regarding the involvement of small molecules known microRNAs in the regulation of genes in infected hosts with *Leishmania*. Moreover, there are reports on the involvement of these small molecules in the sensitivity or resistance of protozoa to different drug. Therefore, this study aimed to investigate the miR-294 expression in macrophage cells following infection with drug-responsive and non responsive *L. tropica*.

Methods: In this study, following culture of glucantime-responsive and -non responsive *L. tropica*, and treatment of macrophage cell line J774 with these parasites, miRNA extraction was carried out at 6, 12, 24, and 72 h after treatment. After cDNA synthesis, TaqMan real-time PCR was used to study the expression of miR-294 in the aforementioned time intervals. ANOVA test was used for the statistical analysis.

Results: According to the results of real-time PCR, the macrophage cells treated with promastigotes of non-responsive or responsive to glucantime of *L. tropica* showed increased expression of miR-294. The highest rate of expression in miR204 was at 24 h following treatment with *L. tropica* responsive to glucantime which showed 428.7 fold-change increased expression. Moreover, according to statistical analyses, there was a significant difference between the expression of miR-294 in the groups of treated cells with non-responsive and responsive strains ($P\text{-value} < 0.0001$). Moreover, each of these groups showed a statistically significant difference between the expression of the miRNA and the control group ($P\text{-value} < 0.0001$).

Conclusion : Along with the results, it could be stated that this miRNA shows a high expression in macrophage cells infected with *L. tropica* responsive to glucantime which may perhaps indicate the involvement of this miRNA in the sensitivity of this protozoan to *L. tropica*. Moreover, this miRNA could be considered as a suitable biomarker for *L. tropica* infections. In fact, it can be used for diagnostic, therapeutic and even vaccine strategies.

Keywords : Leishmaniasis, *Leishmania tropica*, Macrophage, miRNA

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
فهرست جداول.....	ط
فهرست نمودار.....	ي
فهرست اشكال.....	ك
فهرست پيوست ها.....	ل
فهرست کوتاه نوشته ها.....	م
چکیده.....	

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱ مقدمه.....	۲
۱-۲ اهداف کلی.....	۵
۱-۳ اهداف جزئی.....	۶
۱-۴ اهداف کاربردی.....	۶
۱-۵ فرضیات/سوالات تحقیق.....	۶

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱ کلیات.....	۹
۲-۱-۱ لیشمانیوز.....	۹
۲-۱-۲ تاریخچه لیشمانیوز.....	۱۰
۲-۱-۳ طبقه بندی.....	۱۱

۱۱.....	۲-۱-۴ اشکال مختلف لیشمانیوز
۱۱.....	۲-۱-۴-۱ لیشمانیوز احشایی
۱۲.....	۲-۱-۴-۲ لیشمانیوز جلدی
۱۲.....	۲-۱-۵ همه گیری شناسی لیشمانیوز جلدی
۱۳.....	۲-۱-۶ ریخت شناسی و چرخه ی زندگی انگل های لیشمانیا
۱۵.....	۲-۱-۷ درمان
۱۶.....	۲-۱-۸ واکنش بین لیشمانیا و سلول های ماکروفاژ
۱۷.....	۲-۱-۹ RNA های غیر کد کننده
۱۸.....	۲-۱-۹-۱ ساختار ژنی و بیوژنز miRNA
۱۹.....	۲-۱-۹-۲ مکانیسم عمل miRNA
۱۹.....	۲-۱-۹-۳ خاموش کردن ژن بواسطه ی RNA غیر کد کننده
۲۰.....	۲-۱-۱۰ اثرات بالقوه ی تنظیمات اپی ژنتیکی طی عفونت لیشمانیا
۲۰.....	۲-۱-۱۰-۱ تغییر اپی ژنتیکی سلول های ایمنی ذاتی
۲۰.....	۲-۱-۱۰-۲ تغییرات اپی ژنتیکی سیگنالینگ سلولی
۲۱.....	۲-۱-۱۰-۳ کاربردهای اپی ژنتیک
۲۲.....	۲-۱-۱۰-۴ واکسن ها
۲۲.....	۲-۱-۱۰-۵ اپی ژنومیک-درمان
۲۲.....	۲-۱-۱۰-۶ بیومارکرهای اپی ژنتیکی
۲۳.....	۲-۲ مروری بر پژوهش های پیشین

فصل سوم: مواد و روش ها

- ۳-۱ دستگاه ها و مواد مورد استفاده ۳۰
- ۳-۲ پرایمر ها، stem-loop، و پروب های مورد استفاده ۳۲
- ۳-۳ نمونه های مورد مطالعه ۳۳
- ۳-۴ کشت انگل لیشمانیا و تیمار سلول های ماکروفاژ با انگل ۳۴
- ۳-۵ استخراج microRNA ۳۶
- ۳-۵-۱ بررسی کمی و کیفی RNA های استخراج شده به روش نانودراپ ۳۶
- ۳-۵-۲ سنتز cDNA ۳۷
- ۳-۶ مراحل انجام Real Time PCR ۳۸
- ۳-۷ روش آنالیز آماری ۴۰
- ۳-۸ ملاحظات اخلاقی ۴۰

فصل چهارم: نتایج

- ۴-۱ نتایج خلوص RNA و Real-time PCR ۴۲
- ۴-۲ بیان ژن miR-294 در سلول های ماکروفاژ تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف ۴۳
- ۴-۳ بیان ژن miR-294 در سلول های ماکروفاژ تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف ۴۵
- ۴-۴ نتایج آنالیز آماری ۴۷
- ۴-۴-۱ مقایسه میانگین بیان miR-294 در ساعت ۶ ۴۷
- ۴-۴-۲ مقایسه میانگین بیان miR-294 در ساعت ۱۲ ۴۸

۴-۴-۳ مقایسه میانگین بیان miR-294 در ساعت ۲۴..... ۴۹

۴-۴-۴ مقایسه میانگین بیان miR-294 در ساعت ۷۲..... ۵۰

۴-۴-۵ آنالیز آماری و مقایسه دوبه دو متغیر گروه های ماکروفاژ و زمان ۵۱

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱ بحث و نتیجه گیری ۶۰

۵-۳ نتیجه گیری ۶۹

۵-۳ پیشنهادات ۷۰

منابع ۷۳

پیوست ها..... ۸۸

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۳-۱ دستگا‌ه‌های مورد استفاده	۳۰
جدول ۳-۲ مواد مورد استفاده	۳۱
جدول ۳-۳ توالی های پرایمر forward، reverse، stem loop و پروب اختصاصی	۳۳
جدول ۳-۴ مواد لازم جهت سنتز cDNA	۳۷
جدول ۳-۵ برنامه ی دمایی سنتز cDNA	۳۸
جدول ۳-۶ مواد مورد نیاز جهت واکنش Real time PCR	۳۹
جدول ۳-۷ سیکل دمایی واکنش Real time PCR	۴۰
جدول ۴-۱ مقایسه میزان بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 گروه کنترل و گروه تیمار با لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف	۴۳
جدول ۴-۲ مقایسه میزان بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در گروه های ماکروفاژهای کنترل و تیمار شده با لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف	۴۵
جدول ۴-۳ مقایسه توصیفی متوسط بیان miR-294 ماکروفاژ های آلوده به لیشمانیا تروپیکا در گروه های مختلف (کنترل ، پاسخ دهنده به گلوکانتیم و غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم) در زمان های مختلف ۶، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی	۵۵
جدول ۴-۴ مقایسه اثر متقابل دومتغیر گروه (پاسخ دهنده ، غیر پاسخ دهنده و کنترل) و گروه زمان بر بیان miR-294	۵۶

جدول ۴-۵ مقایسه متوسط بیان miR-294 در ماکروفاژهای آلوده به *لشمانیا تروپیکا* در هر گروه (پاسخ دهنده، غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم و کنترل) و در هر زمان و در مقایسه با سایر زمان هادر همین گروه ۵۷

فهرست نمودار

عنوان	صفحه
نمودار ۱-۴ میزان بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت کنترل و در حالت تیمار بالیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف (میزان بیان به صورت لگاریتمی نشان داده شده است).....	۴۴
نمودار ۲-۴ میزان بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت کنترل و در حالت تیمار با لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف (میزان بیان به صورت لگاریتمی نشان داده شده است).....	۴۶
نمودار ۳-۴ میزان بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت کنترل و در حالت تیمار بالیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف (میزان بیان به صورت لگاریتمی نشان داده شده است).....	۴۷
نمودار ۴-۴ مقایسه ی بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت های تیمار نشده با انگل و تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت ۶ ۸.....	۴۸
نمودار ۵-۴ مقایسه ی بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت های تیمار نشده با انگل و تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت ۱۲.....	۴۹
نمودار ۶-۴ مقایسه ی بیان ژن miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت های تیمار نشده با انگل و تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت ۲۴.....	۵۰

نمودار ۷-۴ مقایسه ی بیان miR-294 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت های تیمار نشده
با انگل و تیمار شده با پروماستیگوت *لیشمانیا تروپیکا* غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت
۷۲..... ۵۱

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۱۹.....	شکل ۱-۲ مسیر سنتز و بیوژنز microRNA
۳۳.....	شکل ۱-۳ نحوه اتصال stem loop به microRNA
۳۵.....	شکل ۲-۳ تیمار سلول های ماکروفاژ با انگل.

فهرست پیوست ها

صفحه

عنوان

پیوست شماره یک: برگه اطلاعات ایمنی مواد ۸۳

1. Salam N, Al-Shaqha WM, Azzi A. Leishmaniasis in the Middle East: incidence and epidemiology. PLoS neglected tropical diseases. 2014;8(10):32-58.
2. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis :recent developments in diagnosis and management. American journal of clinical dermatology. 2015;16(2):99-109.
3. Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Hailu A, Mondal D. Evaluation of rapid diagnostic tests : visceral leishmaniasis. Nature reviews microbiology .2007;5(1):30-50.
4. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. PLoS neglected tropical diseases. 2013;7(10):24-78.
5. Srivastav S, Saha A, Barua J, Ukil A, Das PK. IRAK-M regulates the inhibition of TLR-mediated macrophage immune response during late in vitro *Leishmania donovani* infection. European journal of immunology. 2015;45(10):87-97.
6. Bayer-Santos E, Marini MM, da Silveira JF. Non-coding RNAs in host-pathogen interactions: subversion of mammalian cell functions by protozoan parasites. Frontiers in microbiology. 2017;8(1):44-74.
7. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Health-care disparities for foreign residents in Japan Belimumab in kidney transplantation. Plos One. 2019;1(1):12-36.
8. Steverding D. The history of leishmaniasis. Parasites & vectors. 2017;10(1):82-99.
9. Cox FE. History of human parasitology. Clinical microbiology reviews. 2002;15(4):595-612.

10. Lukeš J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2007;104(22):75-80.
11. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology today*. 2000;16(4):142-4.
12. Sundar S, Chakravarty J. Visceral leishmaniasis. Drug resistance in *Leishmania* parasites: Springer; 2018;1(1):159-76.
13. Sundar B. Leishmania Donovanii. In: *Parasitology*. 2014;13(1):56-79.
14. Mokni M. Cutaneous Leishmaniasis. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. 2019;1(1):67-89.
15. D G. A Review on Biology, Epidemiology and public health significance of leishmaniasis. *Journal of bacteriology and parasitology*. 2013;1(7):78-99.
16. Rostami MN, Saghaei A, Vesali E. A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in central Iran. *International journal of infectious diseases*. 2013;17(12):11-26.
17. Maraghi S, Mardanshah O, Rafiei A, Samarbafzadeh A, Vazirianzadeh B. Identification of cutaneous leishmaniasis agents in four geographical regions of Khuzestan province using Nested PCR. *Jundishapur journal of microbiology*. 2013;6(4):12-38.
18. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular microbiology*. 2011;79(3):647-62.
19. Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*. 1990;6(5):37-42.

20. Bates P, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Current molecular medicine. 2004;4(6):601-9.
21. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies : implications for understanding the life cycle. International journal for parasitology. 2003;33(10):1027-34.
22. Pimenta P, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science. 1992;6(6):12-35.
23. Volf P, Hostomska J, Rohousova I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. EDP Sciences. 2008;2(1):13-45.
24. Schlein Y. Leishmania and sandflies : interactions in the life cycle and transmission. Parasitology today. 1993;9(7):255-8.
25. Alvar J, Croft S, Oliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. Advances in parasitology. 2006;6(1):223-74.
26. Lima MIS, Arruda VO, Alves EVC, de Azevedo APS, Monteiro SG, Pereira SRF. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime. Archives of toxicology. 2010;84(3):227-32.
27. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clinical microbiology reviews. 2006;19(1):111-26.
28. Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MsM, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. Immunology letters. 1998;64(2-3):145-51.

29. Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development*. 2008;22(22):3172-83.
30. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):376-85.
31. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews molecular cell biology*. 2014;15(8):509-24.
32. Tetreault N, De Guire V. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical biochemistry*. 2013;46(10-11):842-5.
33. Kumar V, Kumar A, Das S, Kumar A, Abhishek K, Verma S. *Leishmania donovani* activates hypoxia inducible factor-1 α and miR-210 for survival in macrophages by downregulation of NF- κ B mediated pro-inflammatory immune response. *Frontiers in microbiology*. 2018;9(1):38-55.
34. Rana T, Misra S, Mittal MK, Farrow AL, Wilson KT, Linton MF, et al. Mechanism of down-regulation of RNA polymerase III-transcribed non-coding RNA genes in macrophages by *Leishmania*. *Journal of biological chemistry*. 2011;286(8):14-26.
35. Lau CM, Adams NM, Geary CD, Weizman O-E, Rapp M, Pritykin Y, et al. Epigenetic control of innate and adaptive immune memory. *Nature immunology*. 2018;19(9):963-72.
36. Wei L, Vahedi G, Sun H-W, Watford WT, Takatori H, Ramos HL. Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity*. 2010;32(6):840-51.

37. Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. 2014;5(4):51–86.
38. Ayyanathan K. *Epigenetics and Pathology : Exploring connections between genetic mechanisms and disease expression* : Apple academic press; 2013;2(1)13–35.
39. P. B NI, A. K, S. G, H. L. N. *Forensic Science International*. 2017;1(1):13–43.
40. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):10–69.
41. Singh N, Chauhan IS. MicroRNA expression profiling of dibenzalacetone (DBA) treated intracellular amastigotes of *Leishmania donovani*. *Experimental parasitology*. 2018;19(3):5–19.
42. Singh AK, Pandey RK, Shaha C, Madhubala R. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*-infected host cells uncovers the regulatory role of miR30A-3p in host autophagy. *Autophagy*. 2016;12(10):1817–31.
43. Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Scientific reports*. 2017;7(1):24–41.
44. Frank B, Marcu A, Petersen ALdOA, Weber H, Stigloher C, Mottram JC. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. *Parasites & vectors*. 2015;8(1):4–24.

45. Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell host & microbe*. 2013;13(3):277-88.
46. Tiwari N, Kumar V, Gedda MR, Singh AK, Singh VK, Singh SP. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection : delineation of their roles in macrophage dysfunction. *Frontiers in microbiology*. 2017;8(1):3-14.
47. Diotallevi A, De Santi M, Buffi G, Ceccarelli M, Vitale F, Galluzzi L. *Leishmania* infection induces microRNA hsa-miR-346 in human cell line-derived macrophages. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:10(1):9-19.
48. Muxel SM, Acuña SM, Aoki JI, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. Toll-like receptor and miRNA-let-7e expression alter the inflammatory response in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Frontiers in immunology*. 2018;9(1):27-42.
49. Oliane RT, Sharifi I, Afgar A, Jafarzadeh A, Kareshk AT, Bamorovat M. Differential expression of TLRs 2, 4, 9, iNOS and TNF- α and arginase activity in peripheral blood monocytes from glucantime unresponsive and responsive patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Microbial pathogenesis*. 2019;12(6):368-78.
50. Hashemi N, Sharifi M, Tolouei S, Hashemi M, Hashemi C, Hejazi SH. Expression of hsa Let-7a microRNA of macrophages infected by *Leishmania major*. *International journal of medical research & health sciences*. 2018;5(10):27-32.
51. Lago TS, Silva JA, Lago EL, Carvalho EM, Zanette DL, Castellucci LCDC. The miRNA 361-3p, a regulator of GZMB and TNF is associated with therapeutic failure and longer time

healing of cutaneous leishmaniasis caused by *L.(viannia) braziliensis*. *Frontiers in immunology*. 2018;9(1):26–31.

52. Hewson C, Capraro D, Burdach J, Whitaker N, Morris KV. Extracellular vesicle associated long non-coding RNAs functionally enhance cell viability. *Non-coding RNA research*. 2016;1(1):3–11.

53. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee S-S. Therapeutic miRNA and siRNA : moving from bench to clinic as next generation medicine. *Molecular therapy -nucleic acids*. 2017;8(1):132–43.

54. Acuña SM, Floeter-Winter LM, Muxel SM. MicroRNAs : Biological regulators in pathogen-host interactions. *Cells*. 2020;9(1):11–33.

55. Lasjerdi Z, Ghanbarian H, Yeganeh SM, Tabaei SJS, Mohebbi M, Taghipour N. Comparative expression profile analysis of apoptosis-related miRNA and its target gene in *Leishmania major* infected macrophages. *Iranian journal of parasitology*. 2020;15(3):332–40.

56. Nunes S, Silva IB, Ampuero MR, Noronha ALLd, Souza LCLd, Correia TC, et al. Integrated analysis reveals that miR-193b, miR-671, and TREM-1 correlate with a good response to treatment of human localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Frontiers in immunology*. 2018;9(1):6–40.

57. Jung S, Kim WJ, Kim BK, Kim J, Kim MJ, Kim KP, et al. In-particle stem-loop RT-qPCR for specific and multiplex microRNA profiling. *Biosensors and bioelectronics*. 2020;1(1):23–31.

58. Saravolatz LD, Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clinical infectious diseases*. 2006;43(7):917-24.
59. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian journal of medical research*. 2004;11(9):238-58.
60. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*. 1998;28(1):121-34.
61. Cannella D, Brenier-Pinchart M-P, Braun L, Van Rooyen JM, Bougdour A, Bastien . miR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell reports*. 2014;6(5):928-37.
62. Barker KR, Lu Z, Kim H, Zheng Y, Chen J, Conroy AL. miR-155 modifies inflammation, endothelial activation and blood-brain barrier dysfunction in cerebral malaria. *Molecular Medicine*. 2017;23(1):24-33.
63. Mukherjee B, Paul J, Mukherjee S, Mukhopadhyay R, Das S, Naskar K. Antimony-resistant *Leishmania donovani* exploits miR-466i to deactivate host MyD88 for regulating IL-10/IL-12 levels during early hours of infection. *The Journal of immunology*. 2015;195(6):2731-42.
64. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLoS neglect in tropical diseases*. 2013;7(10):24-78.
65. Geraci NS, Tan JC, McDowell MA. Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania*-infected human phagocytes. *Parasite immunology*. 2015;37(1):43-51.

66. Bragato JP, Melo LM, Venturin GL, Rebech GT, Garcia LE, Lopes FL. Relationship of peripheral blood mononuclear cells miRNA expression and parasitic load in canine visceral leishmaniasis. *PloSone*. 2018;13(12):68–76.
67. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM, et al. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):.35–44



بسمه تعالی

تاریخ: ۹۹/۴/۳۰

شماره: ۹۹/۳/۵۴۲

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

کد اخلاق:

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای سجاد ساجدی نیا دانشجوی کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان " بررسی و مقایسه میزان بیان ژن microRNA294 (Mir294) در سل لاین ماکروفاژهای J774 آلوده به سویه های لیسمانیا تروپیکا پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم " در ساعت ۱۲ صبح روز یکشنبه مورخ ۹۹/۴/۳۰ حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استادان راهنما	سرکار خانم دکتر زهرا بابایی جناب آقای دکتر علی افکار	
ب: استادان مشاور	جناب آقای دکتر ایرج شریفی سرکار خانم دکتر تانیا دهش	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر مجید فصیحی هرنندی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	سرکار خانم دکتر فرشته صفاری	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر محمد ابراهیمی پور	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۱۹/۵ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

